

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

## ENGLISH ABSTRACT

Publication Number 09-297137  
Application number 08-139404  
Applicant SHINO-TEST CORPORATION  
Inventor YAMADA SHINGO, et al.  
Title ANTIBODY BOUND TO DENATURED OR MODIFIED  
LIPOPROTEIN, AND MEASUREMENT USING THIS  
ANTIBODY

### Abstract:

5 PROBLEM TO BE SOLVED: To precisely measure a denaturated or modified lipoprotein by use of an antibody which is not bound to a lipoprotein not denaturated or modified, but specifically bonded to the denaturated or modified lipoprotein.

10 SOLUTION: From not more than 50 amino acids containing part or all of amino acid sequence represented by a sequence number 1, peptide is synthesized by liquid phase method or solid phase method. In this invention, said denaturated or modified lipoprotein can be made by oxidation, reduction,

15 disruption, heating or modifying agent. This peptide or its combination with a carrier producing antibody is used as immunogen to immunize a mammal or bird followed by purification to provide a polyclonal antibody or monoclonal antibody. By use of this, a measurement is performed by

20 enzyme immunoassay, fluorescent immunoassay, radiation immunoassay or the like. According to this method, a denaturated or modified lipoprotein can be precisely measured without erroneously measuring lipoprotein not denaturated or modified, LDL and plasminogen.

25



## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **09297137 A**(43) Date of publication of application: **18 . 11 . 97**(51) Int. Cl **G01N 33/53****C07K 7/04****C07K 14/775****C07K 16/18****C12N 15/02****C12P 21/08****G01N 33/531****G01N 33/577****//(C12P 21/08 , C12R 1:91 )**(21) Application number: **08139404**(22) Date of filing: **08 . 05 . 96**(71) Applicant: **SHINOTESUTO:KK**(72) Inventor: **YAMADA SHINGO  
INOUE KEIICHI  
KITAJIMA MEGUMI  
KUBO NOBUHIKO  
SAKURABAYASHI IKUNOSUKE****(54) ANTIBODY BOUND TO DENATURED OR  
MODIFIED LIPOPROTEIN, AND MEASUREMENT  
USING THIS ANTIBODY**

(57) Abstract:

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To precisely measure a denaturated or modified lipoprotein by use of an antibody which is not bound to a lipoprotein not denaturated or modified, but specifically bonded to the denaturated or modified lipoprotein.

**SOLUTION:** From not more than 50 amino acids containing part or all of amino acid sequence represented by a sequence number 1, peptide is

synthesized by liquid phase method or solid phase method. This peptide or its combination with a carrier producing antibody is used as immunogen to immunize a mammal or bird followed by purification to provide a polyclonal antibody or monoclonal antibody. By use of this, a measurement is performed by enzyme immunoassay, fluorescent immunoassay, radiation immunoassay or the like. According to this method, a denaturated or modified lipoprotein can be precisely measured without erroneously measuring lipoprotein not denaturated or modified, LDL and plasminogen.

COPYRIGHT: (C)1997,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-297137

(43) 公開日 平成9年(1997)11月18日

(51) Int.Cl. <sup>9</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/53			G 0 1 N 33/53	W
C 0 7 K 7/04			C 0 7 K 7/04	
14/775			14/775	
16/18			16/18	
C 1 2 N 15/02			C 1 2 P 21/08	

審査請求 未請求 請求項の数 7 F D (全 21 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平8-139404

(22) 出願日 平成8年(1996)5月8日

(71) 出願人 000131474

株式会社シノテスト

東京都千代田区神田神保町一丁目56番地

(72) 発明者 山田 晋吾

神奈川県相模原市大野台二丁目29番14号

株式会社シノテスト相模原事業所内

(72) 発明者 井上 恵一

神奈川県相模原市大野台二丁目29番14号

株式会社シノテスト相模原事業所内

(72) 発明者 北島 恵

神奈川県相模原市大野台二丁目29番14号

株式会社シノテスト相模原事業所内

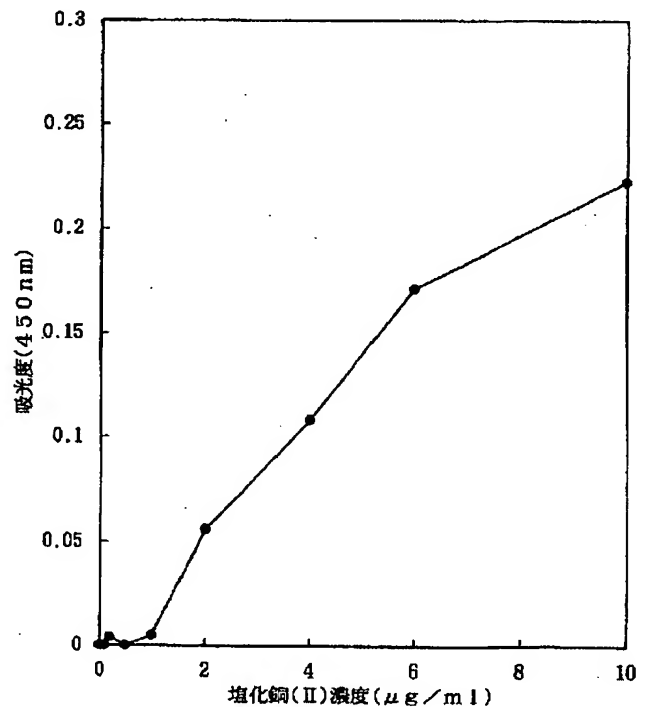
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 変性又は修飾リポタンパク質 (a) に結合する抗体及びこの抗体を用いる測定法

## (57) 【要約】

【目的】 変性又は修飾を受けていないリポタンパク質 (a)、更にプラスミノーゲン及びLDLには結合せず、変性又は修飾を受けたリポタンパク質 (a) に特異的に結合する抗体を提供する。そして、変性又は修飾を受けていないリポタンパク質 (a)、プラスミノーゲン及びLDLを測り込むことなく、変性又は修飾を受けたリポタンパク質 (a) を正確に測定することができる測定法を提供する。

【構成】 変性又は修飾を受けていないリポタンパク質 (a) には結合せず、変性又は修飾を受けたリポタンパク質 (a) に特異的に結合する抗体、及びこの抗体を用いる変性又は修飾を受けたリポタンパク質 (a) の測定法。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 変性又は修飾を受けていないリポタンパク質(a)には結合せず、変性又は修飾を受けたリポタンパク質(a)に特異的に結合する抗体。

【請求項2】 配列表の配列番号1で示されるアミノ酸配列の一部若しくは全体を含む50以内のアミノ酸から構成されるペプチド又はこのペプチドと担体との結合物が免疫原であることを特徴とする、請求項1に記載の抗体。

【請求項3】 変性又は修飾が、酸化、還元、分解、加熱又は変性剤によるものである、請求項1又は請求項2に記載の抗体。

【請求項4】 モノクローナル抗体である、請求項1～請求項3のいずれか1項に記載の抗体。

【請求項5】 ポリクローナル抗体である、請求項1～請求項3のいずれか1項に記載の抗体。

【請求項6】 請求項1～請求項5のいずれか1項に記載の抗体を用いる、変性又は修飾を受けたリポタンパク質(a)の測定法。

【請求項7】 変性又は修飾を受けたリポタンパク質(a)が、酸化、還元、分解、加熱又は変性剤による変性又は修飾を受けたリポタンパク質(a)である、請求項6に記載の測定法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、動脈硬化症促進の危険因子であるとの指摘がなされ、疾患の診断等に重要な役割を有する変性又は修飾を受けたリポタンパク質(a)に特異的に結合する抗体、及びこの抗体を用いる変性又は修飾を受けたリポタンパク質(a)の測定法に関するものである。

【0002】本発明は、臨床検査分野を始めとする医学分野において特に有用なものである。

## 【0003】

【従来の技術】リポタンパク質(a)(lipoprotein(a)、Lp(a))は、1963年ベルクにより $\beta$ -リポタンパク質の変異型として初めて報告された[K. Berg, Acta Pathol. Microbiol. Scand., 59巻, 369～382頁, 1963年]。

【0004】その後種々の検討の結果、リポタンパク質(a)は、通常生体内でコレステロールエステルの輸送を主な役割とする低密度リポタンパク質(LDL)とリポタンパク質(a)に特有なタンパク質であるアポリポタンパク質(a)(apolipoprotein(a)、apo(a)、アポ(a))からなり、LDLのタンパク質部分であるアポリポタンパク質B-100とアポリポタンパク質(a)との間でジスルフィド結合により結合した物質であることが判明した。

【0005】臨床的には狭心症や心筋梗塞をはじめとす

る虚血性心疾患患者でリポタンパク質(a)値が高値のものが多くということが判明した[G. Dahlen et al., Acta Med. Scand. (Suppl.), 531巻, 1～29頁, 1972年, K. Berg et al., Clin. Genet., 16巻, 347～352頁, 1979年, G. M. Kostner et al., Atherosclerosis, 38巻, 51～61頁, 1981年]。

【0006】そして、リポタンパク質(a)は、コレステロール、LDL-コレステロール、HDL-コレステロール等の虚血性心疾患の既知の危険因子とは相関を示さず、動脈硬化症、虚血性心疾患の独立した新規な危険因子であることが報告された[C. Ehnholm et al., Biochim. Biophys. Acta, 236巻, 431～439頁, 1971年, H. Schriewer et al., J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 22巻, 591～596頁, 1984年]。

【0007】1987年、イートンら[D. L. Eaton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 84巻, 3224～3228頁, 1987年]は生化学的手法により、次いでマクリーンら[J. W. McLean et al., Nature, 330巻, 132～137頁, 1987年]はcDNA塩基配列よりアポリポタンパク質(a)のアミノ酸配列を決定した。

【0008】これによりアポリポタンパク質(a)はその分子構造の大部分が、線溶系に働くプラスミノゲン分子と相同性の高い部分から構成されていることが判明した。

【0009】このことはリポタンパク質(a)が、動脈硬化、リポタンパク質、血液凝固線溶系を同一視点で考えるうえでの重要な鍵となることを示唆するものであった。

【0010】また、リポタンパク質(a)が動脈硬化症の危険因子としてだけではなく、糖尿病性腎症あるいはPTCA(経皮的冠動脈内腔拡張術)術後再狭窄をおこした人で高値を示す傾向があるということや、CRPのような急性反応性タンパク質と同様の挙動を示すという報告もあり、血液等の生体中のリポタンパク質(a)を測定することは臨床的に重要な意義を持つものとなっており、リポタンパク質(a)を正確に測定できる方法が望まれていた。

【0011】リポタンパク質(a)の測定は、単純免疫拡散法、ロケット免疫電気泳動法、免疫比濁法、ラテックス比濁法、ラジオイムノアッセイ(RIA)[J. J. Albers et al., J. Lipid Res., 18巻, 331～338頁, 1977年]、及び酵素免疫測定法(EIA、ELISA)[A. Abe et al., Clin. Chim. Acta, 177

巻, 31~40頁, 1988年]等の免疫学的測定法により行われているが、リポタンパク質(a)を免疫原として動物に免疫して得られる抗体をこれらの免疫学的測定法にそのまま使用すると、リポタンパク質(a)はその分子中にLDLを含みそしてプラスミノーゲンと相同性の高い部分を持つため、生体試料に含まれるLDLやプラスミノーゲンとも反応してしまい、LDLやプラスミノーゲンをも測り込んでしまうので、正確なリポタンパク質(a)の測定値を得ることができない。

【0012】そこで、リポタンパク質(a)からLDL部分を除いたアポリポタンパク質(a)を免疫原として用いてリポタンパク質(a)に対する抗血清(ポリクローナル抗体)を作製するという方法が報告されているが[G. M. Fless et al., J. Biol. Chem., 261巻, 8712~8718頁, 1986年, G. Utermann et al., J. Biol. Chem., 265巻, 981~986頁, 1990年]、この方法により得られた抗血清(ポリクローナル抗体)はLDLとは交叉反応を起こさないものの、アポリポタンパク質(a)はプラスミノーゲンと相同性の高い部分を持つために、この抗血清(ポリクローナル抗体)はプラスミノーゲンとは交叉反応性を有する。

【0013】そのため、この抗血清(ポリクローナル抗体)はヒトプラスミノーゲンで吸収操作を行いプラスミノーゲンと反応する抗体を除去するという煩雑な操作を行わなければ使用できないものであった。

【0014】ところで、悪玉リポタンパク質と言われていたLDLでは、酸化等の変性又は修飾を受けたLDLと動脈硬化症の発症機序の関わりが指摘されている。

【0015】それは、変性又は修飾を受けていないLDLでは、細胞のLDL受容体とその細胞内のコレステロールの量に応じてネガティブフィードバック調節を行い、細胞内のLDL量が正常値にコントロールされる。しかし、LDLが生体内で何らかの化学的修飾又は変性を受けて修飾又は変性型LDLになってしまうと、マクロファージにより異物と認識され、マクロファージ内に無制限に取り込まれ泡沫化してしまい、動脈硬化の初期病変として非常に大きな意味を持つというものである

[M. S. Brown, J. L. Goldstein, Science, 232巻, 34~47頁, 1986年]。

【0016】このLDLの場合と同様にリポタンパク質(a)においても、リポタンパク質(a)がある種の酸化を受けると、変性又は修飾を受けていないリポタンパク質(a)には存在しなかった性質が現れて、これにより動脈硬化症促進の危険因子となるということが指摘されている[M. E. Haberland et al., J. Biol. Chem., 267巻, 4143~4151頁, 1992年, J. Galle et al., Europ. J. Pharm., 265巻, 11

1~115頁, 1994年]。

【0017】これは、変性又は修飾を受けたりポタンパク質(a)が、変性又は修飾を受けていないリポタンパク質(a)とは別の異なる面において、動脈硬化症の危険因子となることを意味するものである。

【0018】そして、この動脈硬化症の危険因子として重要である変性又は修飾を受けたりポタンパク質(a)を正確に測定できる方法が望まれていた。

【0019】しかしながら、酸化を受けたLDLと $\beta$ 2-グリコプロテインIの複合体、及び酸化を受けたHDLと $\beta$ 2-グリコプロテインIの複合体を酵素免疫測定法のサンドイッチ法で測定する方法についてはWO95/09363号再公表特許公報に開示されているものの、変性又は修飾を受けていないリポタンパク質(a)には結合せず、変性又は修飾を受けたりポタンパク質(a)に特異的に結合する抗体、及び変性又は修飾を受けたりポタンパク質(a)の測定法については知られていなかった。

【0020】

【発明が解決しようとする課題】本発明者らは、従来存在しなかった、変性又は修飾を受けていないリポタンパク質(a)には結合せず、変性又は修飾を受けたりポタンパク質(a)に特異的に結合する抗体、及び変性又は修飾を受けたりポタンパク質(a)の測定法の開発を目指して鋭意検討を行った結果、変性又は修飾を受けていないリポタンパク質(a)、更にLDL並びにプラスミノーゲンには結合せず、かつ変性又は修飾を受けたりポタンパク質(a)であれば特異的に結合することができる抗体、及び、変性又は修飾を受けていないリポタンパク質(a)、LDL並びにプラスミノーゲンを測り込むことが無く、かつ変性又は修飾を受けたりポタンパク質(a)を正確に測定することができる測定法を完成するに至った。

【0021】

【課題を解決するための手段】本発明は以下の発明よりなるものである。

【0022】(1) 変性又は修飾を受けていないリポタンパク質(a)には結合せず、変性又は修飾を受けたりポタンパク質(a)に特異的に結合する抗体。

【0023】(2) 配列表の配列番号1で示されるアミノ酸配列の一部若しくは全体を含む50以内のアミノ酸から構成されるペプチド又はこのペプチドと担体との結合物が免疫原であることを特徴とする、前記(1)に記載の抗体。

【0024】(3) 変性又は修飾が、酸化、還元、分解、加熱又は変性剤によるものである、前記(1)又は(2)に記載の抗体。

【0025】(4) モノクローナル抗体である、前記(1)、(2)又は(3)に記載の抗体。

【0026】(5) ポリクローナル抗体である、前記

(1)、(2)又は(3)に記載の抗体。

【0027】(6) 前記(1)、(2)、(3)、

(4)又は(5)に記載の抗体を用いる、変性又は修飾を受けたリポタンパク質(a)の測定法。

【0028】(7) 変性又は修飾を受けたリポタンパク質(a)が、酸化、還元、分解、加熱又は変性剤による変性又は修飾を受けたリポタンパク質(a)である、前記(6)に記載の測定法。

【0029】

【発明の実施の形態】

(1) 変性又は修飾を受けたリポタンパク質(a)

本発明において、変性又は修飾を受けたリポタンパク質(a)とは、酸化、還元、加水分解などの分解、加熱、又はタンパク質変性剤などの変性剤等により、一次構造、高次構造若しくは立体構造の変化、分解又は化学的修飾を受け、本来の自然な(ネイティブな)リポタンパク質(a)である変性又は修飾を受けていないリポタンパク質(a)とその構造、組成又は立体的配置が異なってしまったものを言う。

【0030】(2) 抗体

本発明の抗体は、変性又は修飾を受けていないリポタンパク質(a)には結合せず、変性又は修飾を受けたリポタンパク質(a)に特異的に結合する抗体であるが、更に、LDL及びプラスミノーゲンにも結合せず交叉反応を起こさないものである。

【0031】本発明の抗体は、ポリクローナル抗体、ポリクローナル抗体よりなる抗血清、又はモノクローナル抗体のいずれのタイプのものをも含み、又これらの抗体のフラグメント(Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fab'等)をも含むものである。

【0032】(3) 免疫原としてのペプチド

本発明の抗体は、配列表の配列番号1で示されるアミノ酸配列の一部若しくは全体を含む50以内のアミノ酸から構成されるペプチド又はこのペプチドと担体との結合物を免疫原として、動物に免疫することにより取得することができる。

【0033】この免疫原としての配列表の配列番号1で示されるアミノ酸配列の一部若しくは全体を含む50以内のアミノ酸から構成されるペプチドにおけるアミノ酸配列の一部とは、配列番号1で示されるアミノ酸配列中の任意の連続したアミノ酸の配列のことであるが、3個のアミノ酸からなるアミノ酸配列を抗体は認識できるとの報告[F. Hudecz et al., J. Immunol. Methods, 147巻, 201~210頁, 1992年]があるので、配列番号1で示されるアミノ酸配列中の任意の連続した3以上のアミノ酸の配列であることが好ましい。

【0034】そして、この免疫原としての配列表の配列番号1で示されるアミノ酸配列の一部若しくは全体を含む50以内のアミノ酸から構成されるペプチドとは、配

列番号1で示されるアミノ酸配列の一部若しくは全体よりなるペプチドに加えて、そのペプチドのN末端側又はC末端側又はN末端側とC末端側の両方に更にアミノ酸又はペプチドが結合したのも含むということを意味する。

【0035】ここで結合するアミノ酸又はペプチドは、LDL又はプラスミノーゲンと相溶性の高いアミノ酸配列を含まなければ特に制限されるものではない。

【0036】但し、アミノ酸数が増えペプチドが大きくなると、LDL又はプラスミノーゲンとの相溶性が生じてくる可能性があるので、この免疫原としての配列表の配列番号1で示されるアミノ酸配列の一部若しくは全体を含む50以内のアミノ酸から構成されるペプチドは、50以内のアミノ酸から構成されるのが好ましく、アミノ酸数が30以内であればより好ましい。

【0037】(4) 免疫原としてのペプチドの調製  
免疫原としての配列表の配列番号1で示されるアミノ酸配列の一部若しくは全体を含む50以内のアミノ酸から構成されるペプチドは、液相法及び固相法等のペプチド合成の方法により合成することができ、またペプチド自動合成装置を用いてもよく、日本生化学会編「生化学実験講座1 タンパク質の化学IV」、東京化学同人、1975年、泉屋ら「ペプチド合成の基礎と実験」、丸善、1985年、日本生化学会編「続生化学実験講座2 タンパク質の化学 下」、東京化学同人、1987年等に記載された方法に従い合成することができる。

【0038】そして、このペプチドは対応する配列を持つDNAより組換えDNA技術を用いて調製してもよく、日本生化学会編「続生化学実験講座1 遺伝子研究法I」、東京化学同人、1986年、日本生化学会編「続生化学実験講座1 遺伝子研究法II」、東京化学同人、1986年、日本生化学会編「続生化学実験講座1 遺伝子研究法III」、東京化学同人、1987年等を参照して調製を行えばよい。

【0039】(5) 免疫原としてのペプチドと担体の結合物

免疫原としての、配列表の配列番号1で示されるアミノ酸配列の一部若しくは全体を含む50以内のアミノ酸から構成されるペプチドと担体との結合物は、上記記載の配列表の配列番号1で示されるアミノ酸配列の一部若しくは全体を含む50以内のアミノ酸から構成されるペプチドと抗体産生用の担体(キャリア)を結合させたものである。

【0040】担体としては、スカシガイのヘモシアニン(KLH)、ウシ血清アルブミン(BSA)、ヒト血清アルブミン(HSA)、ニワトリ血清アルブミン、ポリ-L-リジン、ポリアラニルリジン、ジバアルミチルリジン、破傷風トキソイド又は多糖類等の担体として公知なものをを用いることができる。

【0041】そして、配列表の配列番号1で示されるア

ミノ酸配列の一部若しくは全体を含む50以内のアミノ酸から構成されるペプチドと担体との結合法は、グルタルアルデヒド法、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド法、マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシサクシニミドエステル法、N-サクシミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオン酸法、ビスジアゾ化ベンジジン法又はジバルミチルリジン法等の公知の結合法を用いることができる。

【0042】また、ニトロセルロース粒子、ポリビニルピロリドン又はリポソーム等の担体に上記のペプチドを吸着させたものを免疫原とすることもできる。

【0043】なお、免疫原が低分子物質の場合には、担体と結合したものを免疫するのが一般的であるものの、アミノ酸数5のペプチドを免疫原としてこれに対する特異抗体を産生させたとの報告〔木山ら「日本薬学会第112年会講演要旨集3」, 122頁, 1992年〕もあるので、担体を使用することは必須ではない。

【0044】(6) ポリクローナル抗体又は抗血清の調製

本発明の抗体において、ポリクローナル抗体及び抗血清は以下の操作により調製することができる。

【0045】まず、上記の配列表の配列番号1で示されるアミノ酸配列の一部若しくは全体を含む50以内のアミノ酸から構成されるペプチド又はこのペプチドと担体との結合物を免疫原として、哺乳動物(マウス、ウサギ、ラット、ヒツジ、ヤギ、ウマ等)又は鳥類(ニワトリ等)に免疫する。

【0046】この免疫原の免疫量は免疫動物の種類、免疫注射部位等により適宜決められるものであるが、例えば、マウスの場合には約5~10週齢のマウス一匹当たり一回につき0.1 $\mu$ g~5mg、好ましくは50 $\mu$ g~1mgの上記ペプチドを含む量の免疫原を免疫注射する。また、ウサギの場合はウサギ一匹当たり一回につき10 $\mu$ g~数十mgの上記ペプチドを含む量の免疫原を免疫注射するのが好ましい。

【0047】なお、この免疫原はアジュバントを添加混合して免疫注射をすることが好ましい。アジュバントとしては、フロイント完全アジュバント、フロイント不完全アジュバント、水酸化アルミニウムアジュバント又は百日咳菌アジュバント等の公知のものを用いることができる。

【0048】免疫注射は、皮下、静脈内、腹腔内又は背部等の部位に行えばよい。

【0049】初回免疫後、2~3週間間隔で皮下、静脈内、腹腔内又は背部等の部位に免疫原を追加免疫注射する。この場合も免疫原はアジュバントを添加混合して追加免疫注射することが好ましい。

【0050】初回免疫の後、免疫動物の血清中の抗体価の測定をELISA法等により繰り返し行い、抗体価がプラトーに達したら全採血を行い、血清を分離して本発

明の抗血清を得る。

【0051】この抗血清を、硫酸アンモニウム、硫酸ナトリウム等による塩析法、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過法、又はアフィニティークロマトグラフィー等の方法、あるいはこれらの方法を組み合わせて抗体の精製を行い、本発明におけるポリクローナル抗体を得ることができる。

【0052】なお、免疫原に担体としてヒト血清アルブミン又はBSAを用いた場合は、得られた抗体あるいは抗血清中にヒト血清アルブミンと交叉反応を起こす抗体が含まれる可能性があるので、このような抗体の除去処理を行うことが好ましい。この除去処理方法としては、担体として用いたヒト血清アルブミン又はBSAを、得られた抗体あるいは抗血清の溶液中に添加して精製した凝集物を取り除くか、担体として用いたヒト血清アルブミン又はBSAを不溶化担体に固相化してアフィニティークロマトグラフィーにより除去する方法等を用いることができる。

【0053】(7) モノクローナル抗体の調製

本発明の抗体におけるモノクローナル抗体の調製法について以下説明を行う。

【0054】モノクローナル抗体は、ケラーらの細胞融合法〔G. Koehler et al., Nature, 256巻, 495~497頁, 1975年〕によるハイブリドーマ、又はエプスタン-バーウイルス等のウイルスによる腫瘍化細胞等の抗体産生細胞により得ることができる。

【0055】細胞融合法によるモノクローナル抗体の調製は、以下の操作により行うことができる。

【0056】まず、上記の配列表の配列番号1で示されるアミノ酸配列の一部若しくは全体を含む50以内のアミノ酸から構成されるペプチド又はこのペプチドと担体との結合物を免疫原として、哺乳動物(マウス、ヌードマウス、ラット等、例えば近交系マウスのBALB/c)又は鳥類(ニワトリ等)に免疫する。

【0057】この免疫原の免疫量は、免疫動物の種類、免疫注射部位等により適宜決められるものであるが、例えば、マウスの場合には一匹当たり一回につき0.1 $\mu$ g~5mgの上記ペプチドを含む量の免疫原を免疫注射するのが好ましい。

【0058】なお、免疫原はアジュバントを添加混合して免疫注射をすることが好ましい。

【0059】アジュバントとしては、フロイント完全アジュバント、フロイント不完全アジュバント、水酸化アルミニウムアジュバント又は百日咳菌アジュバント等の公知なものを用いることができる。

【0060】免疫注射は、皮下、静脈内、腹腔内又は背部等の部位に行えばよい。

【0061】初回免疫後、1~2週間間隔で皮下、静脈内、腹腔内又は背部等の部位に免疫原を追加免疫注射す



る。この追加免疫注射の回数としては2～6回が一般的である。この場合も免疫原はアジュバントを添加混合して追加免疫注射することが好ましい。

【0062】初回免疫の後、免疫動物の血清中の抗体価の測定をELISA法等により繰り返し行い、抗体価がプラトーに達したら、免疫原を生理食塩水（0.9%塩化ナトリウム水溶液）に溶解したものを静脈内又は腹腔内に注射し、最終免疫とする。

【0063】この最終免疫の3～5日後に、免疫動物の脾細胞、リンパ節細胞又は末梢リンパ球等の抗体産生能を有する細胞を取得する。

【0064】この免疫動物より得られた抗体産生能を有する細胞と哺乳動物（マウス、ヌードマウス、ラット等）の骨髓腫細胞（ミエローマ細胞）とを細胞融合させるのであるが、ミエローマ細胞としてはヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシル・トランスフェラーゼ（HGPRT）又はチミジンキナーゼ（TK）等の酵素を欠損した細胞株のものが好ましく、例えば、BALB/cマウス由来のHGPRT欠損細胞株である、P3-X63-Ag8株（ATCC TIB9）、P3-X63-Ag8-U1株（癌研究リサーチソースバンク（JCRB）9085）、P3-NS1-1-Ag4-1株（JCRB 0009）、P3-X63-Ag8・653株（JCRB 0028）又はSP2/O-Ag-14株（JCRB 0029）などを用いることができる。

【0065】細胞融合は、各種分子量のポリエチレングリコール（PEG）、リボソーム又はセンダイウイルス（HVJ）等の融合促進剤を用いて行うか、又は電気融合法により行うことができる。

【0066】ミエローマ細胞がHGPRT欠損株又はTK欠損株のものである場合には、ヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジンを含む選別用培地（HAT培地）を用いることにより、抗体産生能を有する細胞とミエローマ細胞の融合細胞（ハイブリドーマ）のみを選択的に培養し、増殖させることができる。

【0067】このようにして得られたハイブリドーマの培養上清をELISA法やウエスタンブロット法等の免疫学的測定法により測定することにより、変性又は修飾を受けていないリボタンパク質（a）とは結合せず、変性又は修飾を受けたリボタンパク質（a）と特異的に結合する抗体を産生するハイブリドーマを選択することができ、この方法と限界希釈法等の公知のクローニングの方法を組み合わせることで、本発明におけるモノクローナル抗体の産生細胞株を単離して得ることができる。

【0068】このモノクローナル抗体産生細胞株を適当な培地で培養して、その培養上清から本発明のモノクローナル抗体を得ることができるが、培地としては無血清培地又は低濃度血清培地等を用いてもよく、この場合は

抗体の精製が容易となる点で好ましく、DMEM培地、RPMI 164培地又はASF培地103等の培地を用いることができる。

【0069】また、モノクローナル抗体産生細胞株を、これに適合性がありプリスタン等であらかじめ刺激した哺乳動物の腹腔内に注入し、一定期間の後、腹腔にたまった腹水より本発明のモノクローナル抗体を得ることができる。

【0070】このようにして得られたモノクローナル抗体は、硫酸アンモニウム、硫酸ナトリウム等による塩析法、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過法、又はアフィニティークロマトグラフィー等の方法、あるいはこれらの方法を組み合わせることにより、精製された本発明におけるモノクローナル抗体を得ることができる。

#### 【0071】（8） 測定法

本発明の測定法は、上記の変性又は修飾を受けていないリボタンパク質（a）には結合せず、変性又は修飾を受けたリボタンパク質（a）には特異的に結合する抗体を用いる、変性又は修飾を受けたリボタンパク質（a）の測定法であるが、変性又は修飾を受けていないリボタンパク質（a）、LDL及びプラスミノゲンを測り込むことが無く、変性又は修飾を受けたリボタンパク質（a）を正確に測定することができる測定法である。

【0072】この本発明の測定法においては、上記の抗体のうち1種類の抗体を用いるだけでなく、複数種類の抗体を組み合わせることでよい。

【0073】そして、本発明の測定法は、抗体を用いる測定法即ち免疫学的測定法であればいずれの方法においても、その測定法で使用される抗体として上記の抗体を用いることにより、所期の効果を奏するものであって、例えば、酵素免疫測定法（ELISA、EIA）、蛍光免疫測定法、放射免疫測定法（RIA）、発光免疫測定法、酵素抗体法、蛍光抗体法、免疫比濁法、ラテックス凝集反応法、ラテックス比濁法、赤血球凝集反応法、粒子凝集反応法又はウエスタンブロット法等により本測定法は実施することができる。

#### 【0074】（9） 測定試料

本発明の測定法における試料としては、ヒト又は動物の血液、血清、血漿、尿、精液、髄液、唾液、汗、涙、腹水若しくは羊水などの体液、大便、血管若しくは肝臓などの臓器、組織、細胞、又は臓器、組織若しくは細胞の抽出液等、変性又は修飾を受けたリボタンパク質（a）が含まれる可能性のある生体試料であれば対象となる。

【0075】（10） 標識抗体を用いた免疫測定法  
本発明の測定法を、酵素免疫測定法、蛍光免疫測定法、放射免疫測定法又は発光免疫測定法等の標識抗体を用いた免疫測定法により実施する場合には、サンドイッチ法又は競合法により行うこともでき、サンドイッチ法の場合には固相化抗体又は標識抗体等の変性又は修飾を受けたリボタンパク質（a）と直接結合する抗体のうち少な

くとも1種の抗体が上記の抗体であればよい。

【0076】固相担体としては、ポリスチレン、ポリカーボネート、ポリビニルトルエン、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリ塩化ビニル、ナイロン、ポリメタクリレート、ラテックス、ゼラチン、アガロース、セルロース、セファロース、ガラス、金属、セラミックス、又は磁性体等の材質よりなるビーズ、マイクロプレート、試験管、スティック、又は試験片等の形状の固相担体を用いることができる。

【0077】固相化抗体は、固相担体と抗体を物理的吸着法、化学的結合法又はこれらの併用等の公知の方法により調製することができる。

【0078】物理的吸着法による場合は、公知の方法に従い、抗体と固相担体を緩衝液等の溶液中で混合し接触させたり又は緩衝液等に溶解した抗体と固相担体を接触させることにより行うことができる。

【0079】また、化学的結合法により行う場合は、日本臨床病理学会編「臨床病理臨時増刊特集第53号 臨床検査のためのイムノアッセイ技術と応用」、臨床病理刊行会、1983年、日本生化学会編「新生化学実験講座1 タンパク質IV」、東京化学同人、1991年等に記載の公知の方法に従い、抗体と固相担体をグルタルアルデヒド、カルボジイミド、イミドエステル、マレイミド等の二価性の架橋試薬と混合、接触させ、抗体と固相担体のそれぞれのアミノ基、カルボキシル基、チオール基、アルデヒド基又は水酸基等と反応させることにより行うことができる。

【0080】標識物質としては、酵素免疫測定法の場合には、パーオキシダーゼ(POD)、アルカリホスファターゼ(ALP)、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコースオキシダーゼ、乳酸脱水素酵素又はアミラーゼ等を、蛍光免疫測定法の場合には、フルオレセインイソチオシアネート、テトラメチルローダミンイソチオシアネート、置換ローダミンイソチオシアネート又はジクロロトリアジンイソチオシアネート等を、そして放射免疫測定法の場合には、トリチウム、ヨウ素125又はヨウ素131等を用いることができる。また、発光免疫測定法は、NADH-FMNH<sub>2</sub>-ルシフェラーゼ系、ルミノール-過酸化水素-POD系、アクリジニウムエステル系又はジオキセタン化合物系等を用いることができる。

【0081】標識物質と抗体との結合法は、日本臨床病理学会編「臨床病理臨時増刊特集第53号 臨床検査のためのイムノアッセイ技術と応用」、臨床病理刊行会、1983年、日本生化学会編「新生化学実験講座1 タンパク質IV」、東京化学同人、1991年等に記載の公知の方法に従い、抗体と標識物質をグルタルアルデヒド、カルボジイミド、イミドエステル、マレイミド等の二価性の架橋試薬と混合、接触させ、抗体と標識物質のそれぞれのアミノ基、カルボキシル基、チオール

基、アルデヒド基又は水酸基等と反応させることにより結合を行うことができる。

【0082】測定の方法は公知の方法〔日本臨床病理学会編「臨床病理臨時増刊特集第53号 臨床検査のためのイムノアッセイ技術と応用」、臨床病理刊行会、1983年、石川榮治ら編「酵素免疫測定法」、第3版、医学書院、1987年、北川常廣ら編「蛋白質核酸酵素別冊No. 31 酵素免疫測定法」、共立出版、1987年〕により行うことができる。

【0083】例えば、固相化抗体と試料を反応させ、同時に標識抗体を反応させるか、又は洗浄の後に標識抗体を反応させて、固相化抗体-変性又は修飾を受けたリボタンパク質(a)-標識抗体の複合体を形成させる。そして未結合の標識抗体を洗浄分離して、結合標識抗体量又は未結合標識抗体量より試料中の変性又は修飾を受けたリボタンパク質(a)量を測定することができる。

【0084】具体的には、酵素免疫測定法の場合は標識酵素にその至適条件下で基質を反応させ、その反応生成物の量を光学的方法等により測定する。蛍光免疫測定法の場合には蛍光物質標識による蛍光強度を、放射免疫測定法の場合には放射性物質標識による放射線量を測定する。発光免疫測定法の場合は発光反応系による発光量を測定する。

#### 【0085】(11) 凝集反応法

本測定法を免疫比濁法、ラテックス凝集反応法、ラテックス比濁法、赤血球凝集反応法又は粒子凝集反応法等の免疫複合体凝集物の生成を、その透過光や散乱光を光学的方法により測るか、目視的に測る測定法により実施する場合には、溶媒としてリン酸緩衝液、グリシン緩衝液、トリス緩衝液又はグッド緩衝液等を用いることができ、更にポリエチレングリコール等の反応促進剤や非特異的反応抑制剤を含ませてもよい。

【0086】抗体を固相担体に感作させて用いる場合には、固相担体としては、ポリスチレン、スチレン-ブタジエン共重合体、(メタ)アクリル酸エステル類ポリマー、ラテックス、ゼラチン、リボソーム、マイクロカプセル、赤血球、シリカ、アルミナ、カーボンブラック、金属化合物、金属、セラミックス又は磁性体等の材質よりなる粒子を使用することができる。

【0087】この感作の方法としては、物理的吸着法、化学的結合法又はこれらの併用等の公知の方法により行うことができる。

【0088】物理的吸着法による場合は、公知の方法に従い、抗体と固相担体を緩衝液等の溶液中で混合し接触させたり又は緩衝液等に溶解した抗体と固相担体を接触させることにより行うことができる。

【0089】また、化学的結合法により行う場合は、日本臨床病理学会編「臨床病理臨時増刊特集第53号 臨床検査のためのイムノアッセイ技術と応用」、臨床病理刊行会、1983年、日本生化学会編「新生化学実

験講座1 タンパク質ⅠⅤ」, 東京化学同人, 1991年等に記載の公知の方法に従い、抗体と固相担体をグルタルアルデヒド、カルボジイミド、イミドエステル、マレイミド等の二価性の架橋試薬と混合、接触させ、抗体と固相担体のそれぞれのアミノ基、カルボキシル基、チオール基、アルデヒド基又は水酸基等と反応させることにより行うことができる。

【0090】測定の方法は公知の方法により行うことができるが、例えば、光学的方法により測定する場合には、試料と抗体、又は試料と固相担体に感作させた抗体を反応させ、エンドポイント法又はレート法により、透過光や散乱光を測定する。

【0091】また、目視的に測定する場合には、プレートやマイクロタイタープレート等の容器中で、試料と固相担体に感作させた抗体を反応させ、凝集の状態を目視的に判定する。

【0092】なお、目視的に測定する代わりにマイクロプレートリーダー等の機器を用いて測定を行ってもよい。

【0093】

【実施例】以下、実施例により本発明をより具体的に詳述するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

【0094】〔実施例1〕

(配列表の配列番号2で示されるペプチドの合成) 配列表の配列番号1で示されるアミノ酸配列を含むペプチドである配列表の配列番号2で示されるペプチドの合成を行った。

【0095】まず、アプライドバイオシステムズ社 (Applied Biosystems) のモデル430Aペプチド自動合成装置 (Model 430A peptide synthesizer) により、取扱説明書に従って、t-ブトキシカルボニルアミノ酸固相法で当該ペプチドの合成を行った。副反応を抑制するためスカベンジャーとして、ジメチルスルファイド、p-チオクレゾール、m-クレゾール、そしてアニソールの存在下でフッ化水素法により樹脂からの合成したペプチドの脱離を行った。

【0096】その後、ジメチルエーテルによりスカベンジャーを抽出し、そして2N酢酸により合成したペプチドの抽出を行った。

【0097】陰イオン交換樹脂であるダウエックス1-X2 (DOWEX 1-X2) により陰イオン交換カラムクロマトグラフィーを行い精製をして、オクタデシル\*

\* (ODS) カラムでの高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により、メインピークのパターンの確認を行った。

【0098】そして、エバポレーターにより凍結乾燥をして濃縮を行った後、HPLCにより精製を行い分取した。なお、このHPLC精製時の装置及び条件は、山村化学研究所社の逆相ODSカラムYMC-D-ODS-5 (20mm×300mm) を用い、日本分光工業社のTWINCLEポンプ及び日本分光工業社のGP-A40型グラジエーターで0.1%トリフルオロ酢酸 (TFA) 中アセトニトリルの0%から70%のグラジエントを流速7.0ml/分で行い、日本分光工業社製UVIDECE-100V型検出器 (210nm、1.28AUFS) で検出を行った。

【0099】ここで精製分取した合成ペプチドをエバポレーターで凍結乾燥して濃縮した。

【0100】得られた合成ペプチドの純度をHPLCで分析した。装置及び条件は、山村化学研究所社の逆相ODSカラムYMC-R-ODS-5 (4.9mm×300mm) を用い、日本分光工業社のTWINCLEポンプ及び日本分光工業社のGP-A40型グラジエーターで0.1%トリフルオロ酢酸 (TFA) 中アセトニトリルの0%から70%のグラジエントを流速1.0ml/分、25分間で行い、日本分光工業社製UVIDECE-100V型検出器 (210nm、1.28AUFS) で検出を行った。

【0101】この分析の結果を図1に示した。この図において、PKNOはチャート中のピークの番号、TIMEは溶出時間、AREAはピーク面積、CONCは全ピーク面積中のそのピーク面積の比率 (即ちパーセント濃度) を表す。

【0102】

【図1】これより得られた合成ペプチドの純度がほぼ100%であることが分かる。

【0103】また、得られた合成ペプチドのアミノ酸組成分析をミリポア社 (Millipore) のウォーターズ (Waters) ピコタグ (Pico-Tag) アミノ酸分析装置により、取扱説明書に従って行った。なお、ペプチド試料の加水分解は、1%フェノールを含む6N塩酸中150℃で1時間行った。

【0104】このアミノ酸分析の結果を表1に示した。(塩酸加水分解法ではシステインは定量できないので、分析値は省略した。)

【表1】

表1

アミノ酸残基	合成されたペプチドのアミノ酸残基数	
	理論値	実測値
Asx	2	2.0
Arg	1	1.0
Ala	3	2.7
Pro	2	2.0
Val	1	1.0

表1において、Asxはアスパラギン又はアスパラギン酸を表す。

【0105】これより得られた合成ペプチドが、配列表の配列番号2で示されるアミノ酸配列と同一の組成であり、配列表の配列番号2で示されるペプチドであることが確認された。なお、この得られた合成ペプチドの等電点は5であった。また、この合成ペプチドの質量スペクトルを図2に示した。

【0106】

【図2】

〔実施例2〕

(配列表の配列番号2で示されるペプチドと結合した担体よりなる免疫原の調製) 担体であるスカシガイのヘモシアニン(KLH)〔カルピオケム社製〕又はウシ血清アルブミン(BSA)〔生化学工業社製〕10mgを10mMリン酸二水素カリウム-リン酸水素二カリウム緩衝液(pH7.0)に溶解し、これにN,N-ジメチルホルムアミドに溶解している2.5%マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシサクシニミドエステル(MBS)〔ピアース社製〕溶液150μlを加え室温で攪拌しながら30分間反応させた。

【0107】これを4℃中においてある10mMリン酸二水素カリウム-リン酸水素二カリウム緩衝液(pH7.0)で平衡化しておいたゲル濾過カラムであるセファデックスG-25(Sephadex G-25)カラム〔ファルマシア-エルケービー社製〕にかけ、280nmにおける吸光度でモニターして、MBS-担体結合成分を分取した。

【0108】このMBS-担体結合成分をリン酸三ナトリウムでpH7.0に調整し、これに実施例1で合成した配列表の配列番号2で示されるペプチドを添加混合して150分間反応させた。

【0109】反応後、水に対して3回透析した後、凍結乾燥を行って、配列表の配列番号2で示されるペプチドと結合した担体よりなる免疫原を得た。

【0110】なお、担体がKLHの場合、得られた免疫原の収量は3.0mg(収率75%)であり、この得ら

れた免疫原中の配列表の配列番号2で示されるペプチドの量は0.9mgであって、この免疫原中の配列表の配列番号2で示されるペプチドの割合(重量比)は30.3%(W/W)であった。

【0111】また、担体がBSAの場合、得られた免疫原の収量は7.1mg(収率52%)であり、この得られた免疫原中の配列表の配列番号2で示されるペプチドの量は1.5mgであって、この免疫原中の配列表の配列番号2で示されるペプチドの割合(重量比)は21.7%(W/W)であった。よってこのことより、この担体がBSAである免疫原は、担体であるBSA1分子に配列表の配列番号2で示されるペプチドが16~17分子結合したものであることがわかる。

【0112】〔実施例3〕

(変性又は修飾を受けたリポタンパク質(a)に特異的に結合する抗体の調製) 変性又は修飾を受けたリポタンパク質(a)に特異的に結合するモノクローナル抗体を下記のように調製した。

【0113】〔1〕 動物への免疫

(1) 実施例2で得た免疫原(担体がKLHのもの)を400μg/mlになるように生理食塩水(0.9%塩化ナトリウム水溶液)で溶解し、これをフロイント完全アジュバントと等量ずつ混合してエマルジョンとして、8週齢のメスのBALB/cマウス(日本チャールズリバー社)の腹部皮下に0.5mlを免疫注射した。

【0114】(2) 初回免疫から2週間後に、上記の免疫原を200μg/mlになるように生理食塩水で溶解し、これをフロイント不完全アジュバントと等量ずつ混合してエマルジョンとして、その0.5mlにより追加免疫注射を行った。

【0115】この追加免疫注射は2週間おきに行った。

【0116】(3) 免疫動物であるこのマウスの血清中の抗体価を、酵素免疫測定法(ELISA、EIA)にて、初回免疫から6週間目より1週間ごとに測定した。

【0117】このELISA法の操作を以下に示した。

【0118】① 配列表の配列番号1で示されるアミノ

酸配列を含む配列表の配列番号2で示されるペプチドよりなる実施例2で得られた免疫原（担体がBSAのもの）を $5\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように生理食塩水（0.9%塩化ナトリウム水溶液）に溶解し、これを96ウェルマイクロプレート（ヌンク社製）に1ウェル当たり $100\mu\text{l}$ ずつ加え、 $37^\circ\text{C}$ で2時間静置してペプチドの固相化を行った。

【0119】② このマイクロプレートを洗浄液（0.05%ツイーン20（Tween 20）を含むリン酸緩衝生理食塩水（5.59mMリン酸水素二ナトリウム、1.47mMリン酸二水素カリウム、137mM塩化ナトリウム、2.68mM塩化カリウム（pH7.2））で洗浄した後、1%BSAを含む10mMリン酸二水素カリウム-リン酸水素二ナトリウム緩衝液（pH7.2）を1ウェル当たり $300\mu\text{l}$ ずつ加えて、 $37^\circ\text{C}$ で2時間静置してブロッキングを行い、その後再び洗浄液で洗浄した。

【0120】③ このマイクロプレートのウェルに、上記の抗体の産生を検査すべきウェルの上澄み液を $100\mu\text{l}$ ずつ加え、 $37^\circ\text{C}$ で2時間静置して反応を行わせ、その後洗浄液で洗浄した。

【0121】④ また対照として、上記②のマイクロプレートのウェルに、HAT培地を $100\mu\text{l}$ ずつ加え、 $37^\circ\text{C}$ で2時間静置して、その後洗浄液で洗浄した。

【0122】⑤ パーオキシダーゼ（POD）標識抗マウスIgG抗体（アマシャム社製）を3%BSAを含むリン酸緩衝生理食塩水で2,000倍に希釈した後、③及び④のマイクロプレートに1ウェル当たり $100\mu\text{l}$ ずつ加え、 $37^\circ\text{C}$ で2時間静置して反応を行わせた。

【0123】⑥ これを洗浄液で洗浄した後、パーオキシダーゼ反応液（3mM 2,2'-アジノービス（3-エチルベンズチアゾリン-6-スルホン酸）[ABTS]を含む50mMリン酸水素二ナトリウム-24mMクエン酸緩衝液の1mlに対して $2\mu\text{l}$ の1.7%過酸化水素を使用直前に添加したもの）を1ウェル当たり $100\mu\text{l}$ ずつ加え、室温で反応させた。15分後に1ウェル当たり $50\mu\text{l}$ の6N硫酸を加えて反応を停止させた。

【0124】⑦ これをEIAプレートリーダー（パイオラッド社製）にて415nmにおける吸光度の測定を行った。

【0125】（4） 初回免疫から18週間目以降、抗体価がプラトーに達したと認められたので、この免疫動物であるマウスの腹部皮下に、生理食塩水で $800\mu\text{g}/\text{ml}$ とした実施例2で得た免疫原（担体がKLHのもの）の0.5mlを注射した。

【0126】その後3日目に、この免疫動物のマウスより脾臓を取得した。

【0127】〔2〕 骨髄腫細胞の増殖

BALB/cマウス由来のヒポキサンチン・グアニン・

ホスホリボシル・トランスフェラーゼ欠損の骨髄腫細胞株であるP3-X63-Ag8-U1株（癌研究リサーチソースバンク 9085）を、胎生ウシ血清を10%含有しグルタミン、ペニシリン及びストレプトマイシンを補ったRPMI 1640組織培養培地（パイオセル社製）で増殖を行った。

【0128】これは、この骨髄腫細胞を細胞培養用中型ボトル（ヌンク社製、200ml容）内で、ボトルの底面の約8割を細胞が占めるまで増殖させた。なお、細胞数は、トリパン青染料排除法及び血球計で計数を行った。

【0129】〔3〕 細胞融合

（1） 上記の免疫動物のマウスから取得した脾臓を、ステンレススチールメッシュ#200を使用して十分にほぐし、血清を含まないRPMI 1640培地液で洗浄しながら濾過した。

【0130】その後、200gで遠心分離を行い、脾臓細胞を分離した。

【0131】更に、再度血清を含まないRPMI 1640培地液で3回脾臓細胞を洗浄した。

【0132】（2） この脾臓細胞と上記の増殖させたP3-X63-Ag8-U1株骨髄腫細胞を5対1の割合で混合した後、遠心分離を行った。

【0133】混合した細胞を、ポリエチレングリコール1500（PEG1500、ベーリンガー・マンハイム社製）を50%含むRPMI 1640培地液にゆつくりと懸濁した。

【0134】そして、最終的にポリエチレングリコール濃度が5%となるように、これをRPMI 1640培地液で徐々に希釈した。

【0135】（3） これより細胞を遠心分離で分離し、5%のハイブリドマクローニングファクター（オリゲン社製）を含んだS-クローン培地（三光純薬社製）よりなる増殖培地に徐々に分散させた。

【0136】そして、平底の96穴マイクロタイタープレート（ヌンク社製）のウェルに、1ウェル当たり $10^6$ 個/ $100\mu\text{l}$ の細胞数の細胞を植え、5%の二酸化炭素中 $37^\circ\text{C}$ で培養した。

【0137】（4） 細胞融合後1日目に、各ウェルに $100\mu\text{l}$ のHAT培地（上記の増殖培地に0.01mMヒポキサンチン、1.6 $\mu\text{M}$ チミジン及び0.04mMアミノプテリンとなるようにそれぞれを補充したもの、いずれも東京化成社製）を加えた。

【0138】その後3日間は、毎日、約半分のHAT培地を新しいHAT培地と交換し、更にその後は、2~3日ごとに同様の交換を行った。

【0139】（5） 細胞は、顕微鏡で観察を行った。

【0140】ハイブリドマ（融合細胞）のクローンは10日以降より出現し、14日以降に配列表の配列番号1で示されるアミノ酸配列を認識する抗体の産生を検査

するため、ウェルの上澄み液をELISA法でスクリーニングした。

【0141】なお、このELISA法の操作は上記〔1〕の（3）と同様にして行った。

【0142】（6） 上記（5）のスクリーニングにおいて、配列表の配列番号1で示されるアミノ酸配列を認識する抗体を産生していることが判明したウェルのハイブリドーマを、24穴のウェルがあるプレートに拡げて培養し、細胞密度が高くなるに従い、小型ボトル、中型ボトルとスケールを大きくして培養した。

【0143】（7） そして、ハイブリドーマはHT増地（アミノプテリン及びハイブリドーマクローニングファクターを含まないHAT増地）で培養、保持した。

【0144】（8） 配列表の配列番号1で示されるアミノ酸配列を認識する抗体の産生をELISA法により上記（5）と同様にして調べたところ、配列表の配列番号1で示されるアミノ酸配列を含むペプチドよりなる実施例2で得た免疫原（担体がBSAのもの）と結合し、かつBSAとは結合しない抗体を産生する4個のハイブリドーマを確認した。

【0145】〔4〕 ハイブリドーマサブクローニング（1） 上記の4個のハイブリドーマを、限界希釈法にてサブクローニングした。

【0146】これらのハイブリドーマの細胞数を、トリパン青染料排除法及び血球計により計数を行った。

【0147】そして、これらのハイブリドーマを、100 $\mu$ lのHT増地当たり、0.5個の生育細胞数の割合と1個の生育細胞数の割合の2種類の割合で懸濁し、96穴の平底マイクロプレートの1ウェル当たり100 $\mu$ lずつ分注した。

【0148】これを2～3日ごとに増地を交換して、ハイブリドーマを増殖させた。

【0149】（2） 2週間後、顕微鏡下で各ウェルのコロニー数を調べ、そして配列表の配列番号1で示されるアミノ酸配列を含むペプチドよりなる実施例2で得た免疫原（担体がBSAのもの）と結合し、かつBSAとは結合しない抗体を産生するウェルを上記と同様にELISA法で調べた。

【0150】1ウェル中に1コロニーが存在し、そしてこのような抗体を産生するウェルを4個得た。

【0151】（3） これを、24穴のプレートに移し、細胞生育が良好となるまで2週間培養を行った。

【0152】（4） 次に、これらのハイブリドーマが産生する抗体の、変性又は修飾を受けたリボタンパク質（a）との反応性をELISA法で調べた。

【0153】操作は、ハイブリドーマの培養上清について、後に記載した実施例4と同様にして行った。

【0154】この結果、1個のハイブリドーマが、変性又は修飾を受けたリボタンパク質（a）に対する抗体を産生する細胞株であることが判明した。

【0155】（5） このハイブリドーマを、再度上記（1）及び（2）と同様にしてクローニングを行い、それぞれのウェルについて抗体の産生を調べたところ、1ウェル中に1コロニーのハイブリドーマが存在し、そして配列表の配列番号1で示されるアミノ酸配列を含むペプチドよりなる実施例2で得た免疫原（担体がBSAのもの）と結合し、かつBSAとは結合しない抗体を産生するものを全部で9クローン得た。

10 【0156】（6） これらのハイブリドーマのクローニングが産生する抗体の変性又は修飾を受けたリボタンパク質（a）との反応性を、再度上記（4）と同様にELISA法で調べた。

【0157】これより、これら全てのハイブリドーマのクローニングが、変性又は修飾を受けたリボタンパク質（a）に特異的に結合する抗体を産生する細胞であることが確かめられた。

20 【0158】（7） これを本発明の変性又は修飾を受けたリボタンパク質（a）に特異的に結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株〔322H4P2株〕とした。

【0159】このハイブリドーマ細胞株〔322H4P2株〕は、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM P-15611として平成8年5月7日付けにて寄託されている。

【0160】〔5〕 モノクローナル抗体の産生

（1） 得られた変性又は修飾を受けたリボタンパク質（a）に対するモノクローナル抗体産生細胞株を、中型ボトル（ヤンク社製）の中で、底面の約8割を細胞が占めるまでHT増地中で培養を行った。

30 【0161】（2） その後、これらのハイブリドーマを掻き取り、そして200g、5分間の遠心分離を行い集めた。

【0162】次に、これを血清を含まないRPMI1640増地液で3回洗浄した後、2mlのRPMI1640増地液に懸濁した。

40 【0163】（3） 前もって2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカンで処置しておいたオスのBALB/cマウス（日本チャールズリバー社）の腹腔に、上記（2）で得たハイブリドーマ懸濁液1mlを注射した。

【0164】注射から2週間以内に腹部の膨張が認められなかった場合には、再度これを繰り返し行った。

【0165】（4） このマウスの腹部の膨張が認められたときに腹水を採取した。

【0166】これを200g、5分間の遠心分離にかけ、変性又は修飾を受けたリボタンパク質（a）に対するモノクローナル抗体を含む上澄み液をハイブリドーマから分離して取得した。

50 【0167】〔6〕 モノクローナル抗体の精製

（1） 変性又は修飾を受けたリボタンパク質（a）に

対するモノクローナル抗体を含む上澄み液の10mlに、22℃で硫酸ナトリウム1.8gを攪拌しながら加え、硫酸ナトリウムが完全に溶けてから更に1時間攪拌を続けて塩析を行った。

【0168】(2) これを22℃で遠心分離(7000g、15分間)を行い、上澄み液と分離して得た沈殿を、30mM塩化ナトリウムを含む40mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH8.0)2mlに溶解した。

【0169】(3) 次に、これを30mM塩化ナトリウムを含む40mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH8.0)に対して十分に透析した後、1000gで20分間遠心分離して不溶性のものを除去した。

【0170】(4) これを30mM塩化ナトリウムを含む40mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH8.0)で平衡化しておいたDEAE-セルロースイオン交換カラム(セルバ社製)[1×10cm]に流速0.4ml/分を通して、溶出液を2mlずつ集めた。

【0171】(5) 免疫グロブリンG(IgG)が溶出液の素通り画分に含まれていることを280nmの吸光度より確認し、これを集めて2mlに濃縮した。

【0172】(6) 更に、これをプロテインA-セファロースCL-4Bアフィニティークロマトグラフィー(ファルマシア-エルケービー社製)にかけて精製を行い、変性又は修飾を受けたリポタンパク質(a)に特異的に結合するモノクローナル抗体を得た。

【0173】なお、この得られたモノクローナル抗体の量はタンパク質量で7mgであった。

【0174】また、ここで得た変性又は修飾を受けたリポタンパク質(a)に特異的に結合するモノクローナル抗体の抗体クラスとサブタイプは、市販の特異抗マウス免疫グロブリン抗血清(ダコ社製)を用いたオクタロニイ免疫拡散法によりIgG<sub>1</sub>、λ鎖と決定した。

【0175】〔実施例4〕

(酸化による変性又は修飾を受けたリポタンパク質(a)の測定)実施例3で得られた、変性又は修飾を受けたリポタンパク質(a)に特異的に結合する抗体を用いて、変性又は修飾を受けたリポタンパク質(a)の測\*

\* 定系を確立した。

【0176】〔1〕 試料としての変性又は修飾を受けたリポタンパク質(a)の調製

(1) リポタンパク質(a)濃度が高いヒト血清を、超遠心分離を行い比重が1.05以上かつ1.12以下の部分を分取し、更にリジナーセファロース4Bアフィニティークロマトグラフィー(ファルマシア-エルケービー社製)にかけて精製リポタンパク質(a)を得た。

【0177】(2) この精製リポタンパク質(a)を、0.01%アジ化ナトリウムを含む50mMリン酸二水素カリウム-リン酸水素二カリウム緩衝液(pH7.4)で十分に透析した。

【0178】(3) この透析を行った精製リポタンパク質(a)を、0.56mg/mlの濃度になるように0.01%アジ化ナトリウムを含む50mMリン酸二水素カリウム-リン酸水素二カリウム緩衝液(pH7.4)で希釈した後この1.8mlずつを、それぞれ、0、1、2、5、10、20、40、60、100μg/mlの塩化銅(II)(CuCl<sub>2</sub>)〔和光純薬工業社製〕の水溶液0.2mlに添加混合して、それぞれ、0、0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、10.0μg/mlの塩化銅(II)濃度の0.5mg/ml精製リポタンパク質(a)溶液を調製した。

【0179】(4) 上記(3)で調製した各精製リポタンパク質(a)溶液を37℃で12時間加温し、銅(II)イオンによる酸化を行い、酸化による変性又は修飾を受けたリポタンパク質(a)の試料を調製した。

【0180】(5) なお、上記(4)で調製した酸化による変性又は修飾を受けたリポタンパク質(a)の9種類の試料の酸化度を、過酸化脂質の測定試薬である「過酸化脂質テストワコー」(八木法、蛍光法)〔和光純薬工業社製〕で測定した。

【0181】この結果を表2に示した。

【0182】

【表2】



表2

酸化に使用した塩化銅(II)濃度 [ $\mu\text{g/ml}$ ]	TBARS値 [nmol(マロンジアルデヒド換算)/ml]
0.0	0.61
0.1	0.43
0.2	0.51
0.5	1.26
1.0	2.28
2.0	11.92
4.0	13.98
6.0	13.77
10.0	13.79

これより、酸化に使用した塩化銅(II)の濃度が高い試料ほど、酸化度を示すTBARS値[nmol(マロンジアルデヒド換算)/ml]が比例して高くなっていることがわかる。

【0183】よって、酸化に使用した塩化銅(II)の濃度に応じて上記試料のリポタンパク質(a)が酸化を受けていることが確かめられた。

【0184】〔2〕 ELISA法による測定

(1) 実施例3で得られた、変性又は修飾を受けたリポタンパク質(a)に特異的に結合する抗体を、3%BSAを含むリン酸緩衝生理食塩水(5.59mMリン酸水素二ナトリウム、1.47mMリン酸二水素カリウム、137mM塩化ナトリウム、2.68mM塩化カリウム(pH7.2))により15 $\mu\text{g/ml}$ とした後、96ウェルマイクロプレート(ヌンク社製)に1ウェル当たり100 $\mu\text{l}$ ずつ加え、37℃で2時間静置して、変性又は修飾を受けたリポタンパク質(a)に特異的に結合する抗体の固相化を行った(固相化抗体)。

【0185】(2) このマイクロプレートを洗浄液(0.05%ツイーン20(Tween20)を含むリン酸緩衝生理食塩水(pH7.2))で洗浄した後、1%BSAを含む10mMリン酸二水素カリウム-リン酸水素ナトリウム緩衝液(pH7.2)を1ウェル当たり300 $\mu\text{l}$ ずつ加えて、37℃で2時間静置してブロッキングを行い、その後再び洗浄液で洗浄した。

【0186】(3) 上記〔1〕の(4)において、それぞれ、0.0、0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、10.0 $\mu\text{g/ml}$ の濃度の塩化銅(II)により酸化による変性又は修飾を受けたリポタンパク質(a)の9種類の試料を生理食塩水で100倍に希釈した後、(2)で調製したマイクロプレートに

1ウェル当たり100 $\mu\text{l}$ ずつ分注し、37℃で2時間静置して抗原抗体反応を行わせた。

【0187】(4) これを洗浄液で洗浄した後、50 $\mu\text{g/ml}$ になるように3%BSAを含むリン酸緩衝生理食塩水で溶解した、実施例3で得られた変性又は修飾を受けたリポタンパク質(a)に特異的に結合する抗体を、1ウェル当たり100 $\mu\text{l}$ ずつ加え、37℃で2時間静置して反応を行わせ(一次抗体)、その後洗浄液で洗浄した。

【0188】(5) パーオキシダーゼ(POD)標識抗マウスIgG抗体(アマシャム社製)を3%BSAを含むリン酸緩衝生理食塩水で2,000倍に希釈した後、上記(4)のマイクロプレートに1ウェル当たり100 $\mu\text{l}$ ずつ分注し、37℃で2時間静置して反応を行わせた(二次抗体)。

【0189】(6) これを洗浄液で洗浄した後、パーオキシダーゼ反応液(3mM 3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(TMBZ)を含む50mMリン酸水素二ナトリウム-24mMクエン酸緩衝液の1mlに対して2 $\mu\text{l}$ の1.7%過酸化水素を使用直前に添加したもの)を1ウェル当たり100 $\mu\text{l}$ ずつ加え、室温で反応させた。

【0190】15分後に1ウェル当たり100 $\mu\text{l}$ の6N硫酸を加えて反応を停止させた。

【0191】(7) これをEIAマイクロプレートリーダー(バイオラッド社製)にて450nmにおける吸光度の測定を行った。

【0192】これらの酸化による変性又は修飾を受けたリポタンパク質(a)の9種類の試料を測定して得た検量線を図3に示した。なお、この図において、横軸はリポタンパク質(a)の酸化に使用した塩化銅(II)の



濃度、縦軸は450nmにおける吸光度の測定値を表す。但し、吸光度の測定値は、塩化銅(II)濃度0.5mg/mlの試料の吸光度を盲検値として差し引いたものを表した。

#### 【0193】

【図3】この図より、塩化銅(II)濃度が高く酸化度が高いリポタンパク質(a)の試料ほど、吸光度の測定値が高くなっており、リポタンパク質(a)の酸化度に比例した測定値が得られていることがわかる。

【0194】よって、酸化による変性又は修飾において、本発明の抗体が変性又は修飾を受けたリポタンパク質(a)に特異的に結合すること、及び本発明の測定法が変性又は修飾を受けたリポタンパク質(a)を定量的に測定できることが確かめられた。

#### 【0195】〔実施例5〕

(還元による変性又は修飾を受けたリポタンパク質(a)の測定)実施例3で得られた、変性又は修飾を受けたリポタンパク質(a)に特異的に結合する抗体を用いて、変性又は修飾を受けたリポタンパク質(a)の測定系を確立した。

【0196】〔1〕 試料としての変性又は修飾を受けたリポタンパク質(a)の調製

(1) リポタンパク質(a)濃度が高いヒト血清を、超遠心分離を行い比重が1.05以上かつ1.12以下の部分を分取し、更にリジナーセファロース4Bアフィニティークロマトグラフィー(ファルマシアーエルケービー社製)にかけて精製リポタンパク質(a)を得た。

【0197】(2) この精製リポタンパク質(a)を、0.01%アジ化ナトリウムを含む50mMリン酸二水素カリウム-リン酸水素二カリウム緩衝液(pH7.4)で十分に透析した。

【0198】(3) この透析を行った精製リポタンパク質(a)を、0.56mg/mlの濃度になるように生理食塩水で希釈した後この1.8mlずつを、それぞれ、0、0.1、1、5、10、50%の2-メルカプトエタノール〔東京化成社製〕の水溶液0.2mlに添加混合して、それぞれ、0、0.01、0.1、0.5、1.0、5.0%の2-メルカプトエタノール濃度の0.5mg/ml精製リポタンパク質(a)溶液を調製した。

【0199】(4) 上記(3)で調製した各精製リポタンパク質(a)溶液を37℃で3時間加温し、2-メルカプトエタノールによる還元を行い、還元による変性又は修飾を受けたリポタンパク質(a)の試料を調製した。

【0200】〔2〕 ELISA法による測定  
測定操作は、上記実施例4の〔2〕の(1)~(7)の工程と同様にして行った。但し、試料を、酸化による変性又は修飾を受けたリポタンパク質(a)の9種類の試料から、それぞれ、0、0.01、0.1、0.5、

1.0、5.0%の濃度の2-メルカプトエタノールにより、還元による変性又は修飾を受けたリポタンパク質(a)の6種類の試料に変えて、測定を行った。

【0201】これらの還元による変性又は修飾を受けたリポタンパク質(a)の6種類の試料を測定して得た検量線を図4に示した。なお、この図において、横軸はリポタンパク質(a)の還元を使用した2-メルカプトエタノールの濃度、縦軸は450nmにおける吸光度の測定値を表す。但し、吸光度の測定値は、2-メルカプトエタノール濃度0%の試料の吸光度を盲検値として差し引いたものを表した。

#### 【0202】

【図4】この図より、2-メルカプトエタノール濃度が高く、より強く還元を受けたリポタンパク質(a)の試料ほど、吸光度の測定値が高くなっており、リポタンパク質(a)の還元度に比例した測定値が得られていることがわかる。

【0203】よって、還元による変性又は修飾においても、本発明の抗体が変性又は修飾を受けたリポタンパク質(a)に特異的に結合できること、及び本発明の測定法が変性又は修飾を受けたリポタンパク質(a)を定量的に測定できることが確かめられた。

#### 【0204】〔実施例6〕

(分解による変性又は修飾を受けたリポタンパク質(a)の測定)実施例3で得られた、変性又は修飾を受けたリポタンパク質(a)に特異的に結合する抗体を用いて、変性又は修飾を受けたリポタンパク質(a)の測定系を確立した。

【0205】〔1〕 試料としての変性又は修飾を受けたリポタンパク質(a)の調製

(1) リポタンパク質(a)濃度が高いヒト血清を、超遠心分離を行い比重が1.05以上かつ1.12以下の部分を分取し、更にリジナーセファロース4Bアフィニティークロマトグラフィー(ファルマシアーエルケービー社製)にかけて精製リポタンパク質(a)を得た。

【0206】(2) この精製リポタンパク質(a)を、0.1M塩化ナトリウム、0.04%EDTA及び0.01%アジ化ナトリウムを含む50mM酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.8)で十分に透析した。

【0207】(3) この透析を行った精製リポタンパク質(a)を、0.5mg/mlの濃度になるように0.1M塩化ナトリウム、0.04%EDTA及び0.01%アジ化ナトリウムを含む50mM酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.8)で希釈した後この2.0mlずつに、上記緩衝液に溶解したそれぞれ、0、500、1、000、2、000ng/mlのカテプシンD〔シグマ社製〕0.01mlを添加混合して、それぞれ、0、5.0、10.0、20.0ng/mlのカテプシンD濃度の0.5mg/ml精製リポタンパク質(a)溶液を調製した。

【0208】(4) 上記(3)で調製した各精製リボタンパク質(a)溶液を37℃で90分間加温し、プロテアーゼ(タンパク質加水分解酵素)であるカテプシンDによるリボタンパク質(a)の加水分解を行い、分解による変性又は修飾を受けたリボタンパク質(a)の試料を調製した。

【0209】(2) ELISA法による測定  
測定の操作は、上記実施例4の〔2〕の(1)～(7)の工程と同様にして行った。但し、試料を、酸化による変性又は修飾を受けたリボタンパク質(a)の9種類の試料から、それぞれ、0、5、10、20、40 ng/mlの濃度のカテプシンDにより、分解による変性又は修飾を受けたリボタンパク質(a)の4種類の試料に変えて、測定を行った。

【0210】これらの分解による変性又は修飾を受けたリボタンパク質(a)の4種類の試料を測定して得た検量線を図5に示した。なお、この図において、横軸はリボタンパク質(a)の分解に使用したカテプシンDの濃度、縦軸は450nmにおける吸光度の測定値を表す。但し、吸光度の測定値は、カテプシンD濃度0 ng/mlの試料の吸光度を盲検値として差し引いたものを表した。

#### 【0211】

【図5】この図より、カテプシンD濃度が高く、より強く分解を受けたリボタンパク質(a)の試料ほど、吸光度の測定値が高くなっており、リボタンパク質(a)の分解度に比例した測定値が得られていることがわかる。

【0212】よって、分解による変性又は修飾においても、本発明の抗体が変性又は修飾を受けたリボタンパク質(a)に特異的に結合すること、及び本発明の測定法が変性又は修飾を受けたリボタンパク質(a)を定量的に測定できることが確かめられた。

【0213】これらのことより、本発明の変性又は修飾を受けたリボタンパク質(a)に特異的に結合する抗体そして変性又は修飾を受けたリボタンパク質(a)の測定法は、一次構造、高次構造若しくは立体構造の変化、分解又は化学的修飾を受け、本来の自然な(ネイティブな)リボタンパク質(a)とその構造、組成又は立体的配置が異なってしまった変性又は修飾を受けたリボタンパク質(a)であれば、特異的に結合することができ、そして正確に測定が行えるものであることが確認された。

#### 【0214】〔参考例1〕

(本発明の抗体の変性又は修飾を受けていないリボタンパク質(a)、LDL及びプラスミノゲンとの反応性の検討) 実施例3で得られた、変性又は修飾を受けたリボタンパク質(a)に特異的に結合する抗体の、プラスミノゲン、LDL及び変性又は修飾を受けていないリボタンパク質(a)との反応性をウエスタンブロット法で確かめた。

【0215】〔1〕 プラスミノゲン、LDL及びリボタンパク質(a)の調製

(1) プラスミノゲン濃度が高いヒト血漿を、超遠心分離を行い比重が1.21以上の部分を分取し、リジンセファロース4Bアフィニティークロマトグラフィー(ファルマシアーエルケービー社製)にかけ、更に抗リボタンパク質(a)抗体(イムノ社製)をリガンドとして結合させたアフィニティークロマトグラフィーにかけて素通り画分を分取し、精製プラスミノゲンを得た。

【0216】(2) LDL濃度が高いヒト血清を、超遠心分離を行い比重が1.006以上かつ1.063以下の部分を分取し、抗リボタンパク質(a)抗体(イムノ社製)をリガンドとして結合させたアフィニティークロマトグラフィーにかけて素通り画分を分取して、精製LDLを得た。

【0217】(3) リボタンパク質(a)濃度が高いヒト血清を、超遠心分離を行い比重が1.05以上かつ1.12以下の部分を分取し、更にリジンセファロース4Bアフィニティークロマトグラフィー(ファルマシアーエルケービー社製)にかけて、精製された変性又は修飾を受けていないリボタンパク質(a)を得た。

【0218】〔2〕 ウエスタンブロット法による反応性の測定

(1) ウエスタンブロット法において泳動させる抗原を、以下のように調製した。

【0219】① 精製プラスミノゲン抗原： 上記〔1〕の(1)の精製プラスミノゲンを、0.5 mg/mlになるように生理食塩水で希釈した。

【0220】② 精製LDL及び精製リボタンパク質(a)抗原： 上記〔1〕の(2)の精製LDL及び上記〔1〕の(3)の精製された変性又は修飾を受けていないリボタンパク質(a)を、それぞれ混合液中で0.5 mg/mlになるように生理食塩水で希釈、混合した。

【0221】③ 精製リボタンパク質(a)抗原： 上記〔1〕の(3)の精製された変性又は修飾を受けていないリボタンパク質(a)を、0.5 mg/mlになるように生理食塩水で希釈した。

【0222】(2) 上記(1)で調製した、精製プラスミノゲン抗原、精製LDL及び精製リボタンパク質(a)抗原、及び精製リボタンパク質(a)抗原それぞれの2 µlずつをタイタン・ジェル・リボ蛋白電気泳動キット(ヘレナ研究所社製)を用いて電気泳動を行った。なお、支持体はアガロースゲルであり、泳動緩衝液はバルビタール緩衝液(pH 8.8)を使用して、電圧90Vで75分間通電して行った。

【0223】(3) 転写はノバ・プロット・エレクトロフォレティック・トランスファー・キット(ファルマシアーエルケービー社製)を用いて、その使用説明書に

従い、ドライ方式で行った。

【0224】(4) 転写用装置上においた(2)のアガロースゲルの上に、9cm×9cmのニトロセルロース膜(バイオラッド社製)を重ね、48mMトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン、39mMグリシン、0.0375%(W/V)ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、20%(V/V)メタノールよりなる転写用緩衝液を用いて、電流65mAで2時間転写を行った。

【0225】(5) 転写を行ったニトロセルロース膜を、1%BSAを含むリン酸緩衝生理食塩水(5.59mMリン酸水素二ナトリウム、1.47mMリン酸二水素カリウム、137mM塩化ナトリウム、2.68mM塩化カリウム(pH7.2))20mlに4℃で1晩浸漬して、ブロッッキングを行った。

【0226】(6) 次にこれを洗浄液(0.05%ツイーン20(Tween20)を含むリン酸緩衝生理食塩水)20ml中で10分間振とう洗浄を行った。この操作を3回行った。

【0227】(7) 実施例3で得られた変性又は修飾を受けたリボタンパク質(a)に特異的に結合する抗体を、20mlのリン酸緩衝生理食塩水に80μg溶解し、この溶液に(6)の操作を行ったニトロセルロース膜を室温で2時間浸漬して反応させた。

【0228】(8) なお対照として、実施例3で得られた変性又は修飾を受けたリボタンパク質(a)に特異的に結合する抗体の代わりに、同濃度のヒツジ抗リボタンパク質(a)抗体(イムノ社製)、LDLの構成成分のアポリボタンパク質B-100に対する同濃度のヤギ抗アポリボタンパク質B抗体(インターナショナルエンザイム社製)、及び同濃度のヤギ抗プラスミノーゲン抗体(医学生物学研究所社製)の混合物(抗体混合物)を用いて、上記(7)の操作を行った。

【0229】また、陰性対照として、(6)で得られたニトロセルロース膜に、実施例3で得られた変性又は修飾を受けたリボタンパク質(a)に特異的に結合する抗体、ヒツジ抗リボタンパク質(a)抗体、ヤギ抗アポリボタンパク質B抗体及びヤギ抗プラスミノーゲン抗体のいずれも作用させないものを用意した。

【0230】(9) 上記(7)又は(8)の操作を行ったニトロセルロース膜を洗浄液20mlで10分間振とう洗浄を行った。これを3回行った。

【0231】(10) 次に、パーオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体(ダコ社製)、パーオキシダーゼ標識抗ヒツジIgG抗体(ダコ社製)及びパーオキシダーゼ標識抗ヤギIgG抗体(ダコ社製)を3%BSAを含むリン酸緩衝生理食塩水で500倍希釈をして20mlの溶液を調製し、これにニトロセルロース膜を室温で2時間浸漬して反応させた。

【0232】(11) このニトロセルロース膜を洗浄液20mlで10分間振とう洗浄を行った。この操作を

3回行った。

【0233】(12) 0.025%3,3'-ジアミノベンジジン四塩酸塩及び0.01%過酸化水素を含むリン酸緩衝生理食塩水20mlに室温で15分間(11)のニトロセルロース膜を浸漬して発色させた。

【0234】〔3〕 測定結果

このウエスタンブロット法の結果を図6に示した。

【0235】なお、この図において、「3」は陰性対照であり、「4」は対照であって精製プラスミノーゲン抗原を泳動後転写した膜に抗体混合物を作用させたもの、

「5」も対照であって精製LDL及び精製リボタンパク質(a)抗原を泳動後転写した膜に抗体混合物を作用させたもの、「6」も対照であって精製リボタンパク質

(a)抗原を泳動後転写した膜に抗体混合物を作用させたものであって、そして、「7」は精製プラスミノーゲン抗原を泳動後転写した膜に実施例3で得られた変性又は修飾を受けたリボタンパク質(a)に特異的に結合する抗体を作用させたもの、「8」は精製LDL及び精製リボタンパク質(a)抗原を泳動後転写した膜に実施例3で得られた変性又は修飾を受けたリボタンパク質

(a)に特異的に結合する抗体を作用させたもの、「9」は精製リボタンパク質(a)抗原を泳動後転写した膜に実施例3で得られた変性又は修飾を受けたリボタンパク質(a)に特異的に結合する抗体を作用させたものである。

【0236】

【図6】この図より、対照である「4」、「5」及び「6」において市販のヒツジ抗リボタンパク質(a)抗体、ヤギ抗アポリボタンパク質B抗体及びヤギ抗プラスミノーゲン抗体それぞれが発色を示す位置に、実施例3で得られた変性又は修飾を受けたリボタンパク質(a)に特異的に結合する抗体を作用させた「7」、「8」及び「9」においては発色が認められないことがわかる。

【0237】よって、本発明の変性又は修飾を受けたリボタンパク質(a)に特異的に結合する抗体は、プラスミノーゲン、LDL、及び変性又は修飾を受けていないリボタンパク質(a)のいずれとも結合しないことが確かめられた。

【0238】なお、実施例3で得られた変性又は修飾を受けたリボタンパク質(a)に特異的に結合する抗体、ヒツジ抗リボタンパク質(a)抗体、ヤギ抗アポリボタンパク質B抗体及びヤギ抗プラスミノーゲン抗体のいずれも作用させていない陰性対照「3」に発色が見られないことから、非特異的な発色が起きていないことが示された。

【0239】〔参考例2〕

(本発明の抗体の配列表の配列番号2で示されるペプチドとの反応性の検討)実施例3で得られた変性又は修飾を受けたリボタンパク質(a)に特異的に結合する抗体の、配列表の配列番号1で示されるアミノ酸配列を含む

ペプチドである配列表の配列番号2で示されるペプチドとの反応性をELISA法で確かめた。

【0240】〔1〕 配列表の配列番号2で示されるペプチドよりなる試料の調製

実施例2で得られた、免疫原である、配列表の配列番号1で示されるアミノ酸配列を含むペプチドである配列表の配列番号2で示されるペプチドと担体(BSA)との結合物を、100ng/ml、200ng/ml、及び300ng/mlになるように生理食塩水に溶解して、3種類の試料を調製した。

【0241】〔2〕 ELISA法による測定  
測定の操作は、上記実施例4の〔2〕の(1)～(7)の工程と同様にして行った。但し、試料を、酸化による変性又は修飾を受けたリポタンパク質(a)の9種類の試料から、上記〔1〕で調製した100ng/ml、200ng/ml、及び300ng/mlの濃度の配列表の配列番号2で示されるペプチドと担体(BSA)との結合物の3種類の試料に変えて、測定を行った。

【0242】これらの3種類の試料を測定して得た検量線を図7に示した。なお、この図において、横軸は配列表の配列番号1で示されるアミノ酸配列を含むペプチドである配列表の配列番号2で示されるペプチドと担体(BSA)との結合物の濃度、縦軸は450nmにおける吸光度の測定値を表す。但し、吸光度の測定値は、生理食塩水を試料として測定した時の吸光度を盲検値として差し引いたものを表した。

【0243】

【図7】この図より、配列表の配列番号1で示されるアミノ酸配列を含むペプチドである配列表の配列番号2で示されるペプチドと担体(BSA)との結合物の測定のグラフが原点を通る直線であり、定量的に測定が行えており、本発明の抗体がこのペプチドと担体の結合物に特異的に結合することがわかる。

【0244】よって、本発明の抗体が配列表の配列番号1で示されるアミノ酸配列を特異的に認識することが確かめられた。

【0245】〔参考例3〕

\* (本発明の測定法における血清試料の影響の検討) 本発明の変性又は修飾を受けたリポタンパク質(a)に特異的に結合する抗体を用いる変性又は修飾を受けたリポタンパク質(a)の測定法が、血清試料の影響を受けないことを、ELISA法での添加回収試験により確認した。

【0246】〔1〕 添加回収試験の試料の調製  
変性又は修飾を受けたリポタンパク質(a)を含まないことを確認してある2種類の血清(A、B)を用意し、これをベースに以下の試料を調製した。

【0247】① 2種類の血清(A、B)0.9mlに対して生理食塩水0.1mlをそれぞれ添加混合した2種類の試料。〔試料①〕

② 生理食塩水で3,000ng/mlとした実施例2で得られた免疫原である配列表の配列番号1で示されるアミノ酸配列を含むペプチドである配列表の配列番号2で示されるペプチドと担体(BSA)との結合物0.1mlを、2種類の血清(A、B)それぞれの0.9mlに対して添加混合することにより、①で調製した2種類の血清試料の配列表の配列番号2で示されるペプチドと担体との結合物の濃度を300ng/ml増加させた2種類の試料。〔試料②〕

③ 実施例2で得られた免疫原である配列表の配列番号1で示されるアミノ酸配列を含むペプチドである配列表の配列番号2で示されるペプチドと担体(BSA)との結合物を生理食塩水で希釈して300ng/mlとした試料。〔試料③〕

〔2〕 ELISA法による測定  
測定の操作は、上記実施例4の〔2〕の(1)～(7)の工程と同様にして行った。但し、試料を、酸化による変性又は修飾を受けたリポタンパク質(a)の9種類の試料から、上記〔1〕で調製した5種類の試料に変えて測定を行った。

【0248】これらの5種類の試料を測定して求めた吸光度値を表3にまとめた。

【0249】

〔表3〕

\*

33  
表3

34

	血清 A	血清 B
① 血清と生理食塩水を混合した試料〔試料①〕の吸光度	0.149	0.224
③ 300ng/mlの配列表の配列番号2で示されるペプチドと担体との結合物の試料〔試料③〕	1.163	1.163
④ ①の血清試料の配列表の配列番号2で示されるペプチドと担体との結合物の濃度を300ng/ml増加させた時の理論上の吸光度(①+③)	1.312	1.387
② ①の血清試料の配列表の配列番号2で示されるペプチドと担体との結合物の濃度を300ng/ml増加させた試料〔試料②〕の吸光度	1.337	1.376
⑤ 吸光度の測定値の理論値に対する比率(②/④)	102%	99.2%

この表より、本発明の変性又は修飾を受けたリポタンパク質(a)の測定法では、血清試料の測定でもほぼ理論値通りの測定値が得られることが判明した。

【0250】よって、本発明の測定法は、血清試料による非特異的反応等の影響を受けずに正確に測定できる方法であることがわかり、臨床検査等において実用上問題のないことが確かめられた。

#### 【0251】

【作用】本発明の変性又は修飾を受けたリポタンパク質(a)に特異的に結合する抗体が、変性又は修飾を受けていないリポタンパク質(a)には結合せず、本来の自然な(ネイティブな)リポタンパク質(a)とはその構造、組成又は立体的配置が異なってしまった変性又は修飾を受けたリポタンパク質(a)に特異的に結合することができることの理由は現在のところ明らかではない。

【0252】推測ではあるが、リポタンパク質(a)が変性又は修飾を受けることにより、分子内部に存在した配列表の配列番号1で示されるアミノ酸配列の部分が分子表面に出てきたり、分子の立体構造が変化して配列表の配列番号1で示されるアミノ酸配列の部分も立体構造が変化することによるなどして、配列表の配列番号1で示されるアミノ酸配列を認識することができる本発明の抗体と結合することができるようになるためではないかと考えられる。

【0253】つまり、リポタンパク質(a)の配列表の配列番号1で示されるアミノ酸配列の部分がリポタンパク質(a)の変性又は修飾を特徴的に現す部位であるために、上記のことが可能になるのではないかと推察される。

#### 【0254】

【発明の効果】本発明の変性又は修飾を受けたリポタン

\* 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620 625 630 635 640 645 650 655 660 665 670 675 680 685 690 695 700 705 710 715 720 725 730 735 740 745 750 755 760 765 770 775 780 785 790 795 800 805 810 815 820 825 830 835 840 845 850 855 860 865 870 875 880 885 890 895 900 905 910 915 920 925 930 935 940 945 950 955 960 965 970 975 980 985 990 995 1000

質(a)に特異的に結合する抗体は、変性又は修飾を受けていないリポタンパク質(a)、更にLDL及びプラスミノゲンには結合せず、かつ変性又は修飾を受けたリポタンパク質(a)であれば特異的に結合することができるという特徴、効果を有するものである。

【0255】そして、本発明の変性又は修飾を受けたリポタンパク質(a)の測定法は、変性又は修飾を受けていないリポタンパク質(a)、LDL及びプラスミノゲンのいずれをも測り込むことが無く、かつ変性又は修飾を受けたリポタンパク質(a)を正確に測定することができるという特徴、効果を有するものである。

#### 【0256】

##### 【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：9

配列の型：アミノ酸

トポロジー：不明

配列の種類：ペプチド

##### 配列：

Arg Asn Pro Asp Ala Val Ala Ala Pro

1

5

配列番号：2

配列の長さ：10

配列の型：アミノ酸

トポロジー：不明

配列の種類：ペプチド

##### 配列：

Cys Arg Asn Pro Asp Ala Val Ala Ala Pro

1

5

10

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】実施例1で得られた配列表の配列番号2で示さ

れるペプチドのHPLCによる分析結果を示した図である。

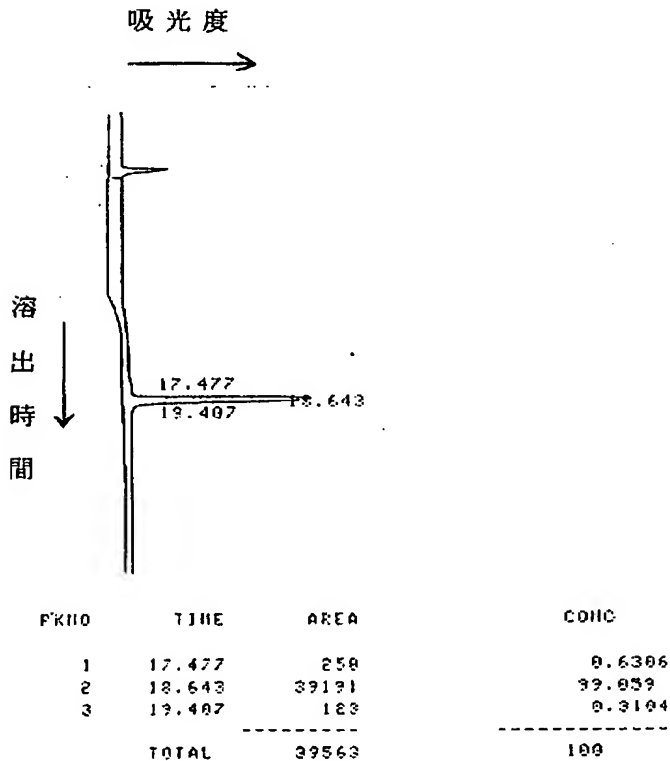
【図2】実施例1で得られた配列表の配列番号2で示されるペプチドの質量スペクトルを示した図である。

【図3】本発明の測定法により、酸化による変性又は修飾を受けたリポタンパク質(a)の9種類の試料を測定して得た検量線を示した図である。

【図4】本発明の測定法により、還元による変性又は修飾を受けたリポタンパク質(a)の6種類の試料を測定して得た検量線を示した図である。

【図5】本発明の測定法により、分解による変性又は修飾を受けたリポタンパク質(a)の4種類の試料を測定\*

【図1】

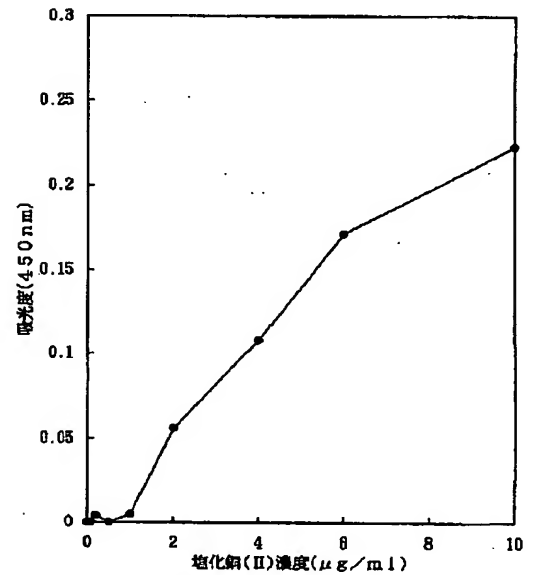


\*して得た検量線を示した図である。

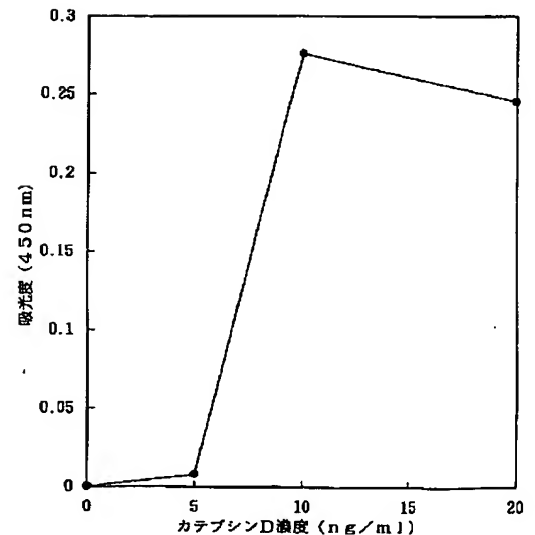
【図6】実施例3で得られた変性又は修飾を受けたリポタンパク質(a)に特異的に結合する抗体の、プラスミノーゲン、LDL及び変性又は修飾を受けていないリポタンパク質(a)への反応性をウエスタンブロット法で確かめた電気泳動のパターンを示す写真である。

【図7】実施例3で得られた変性又は修飾を受けたリポタンパク質(a)に特異的に結合する抗体を用いたELISA法により、配列表の配列番号2で示されるペプチドと担体の結合物の3種類の試料を測定して得た検量線を示した図である。

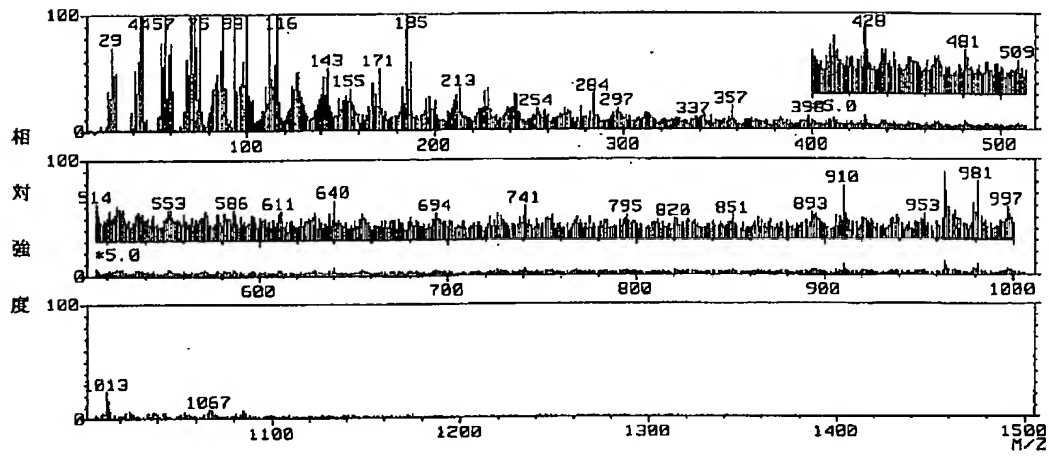
【図3】



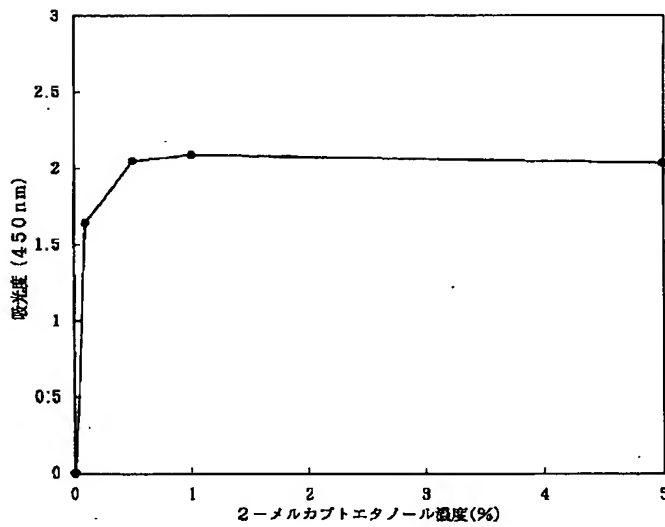
【図5】



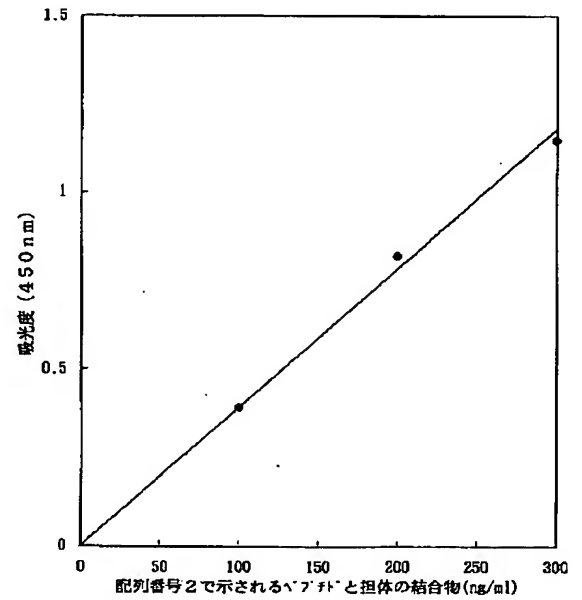
【図2】



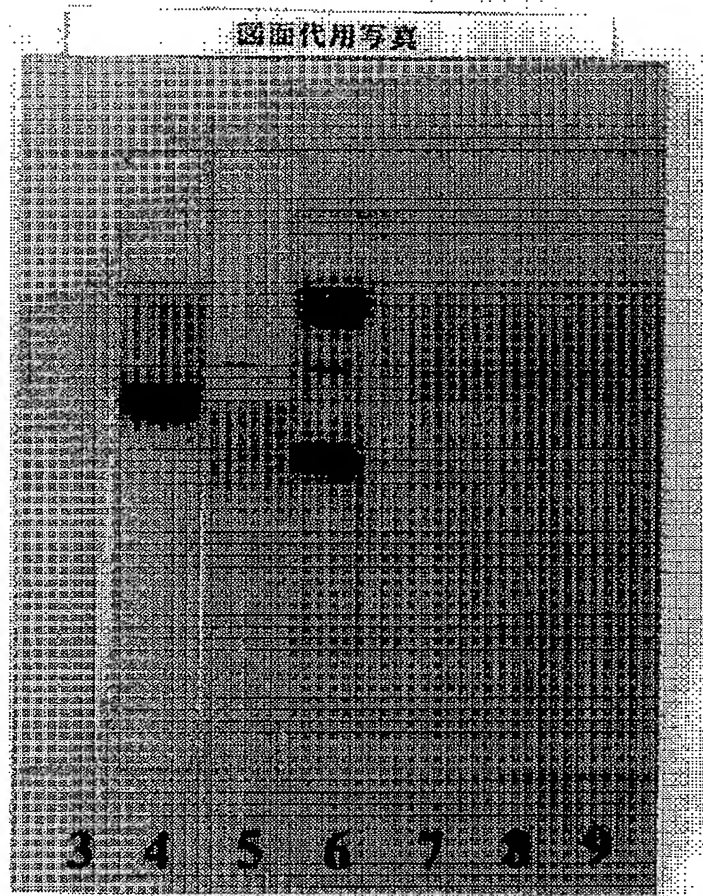
【図4】



【図7】



【図6】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 21/08			G 0 1 N 33/531	A
G 0 1 N 33/531			33/577	B
33/577		9282-4B	C 1 2 N 15/00	C
/(C 1 2 P 21/08				
C 1 2 R 1:91)				

(72)発明者 久保 信彦  
 埼玉県大宮市天沼町1-847 自治医科大学 大宮医療センター内

(72)発明者 櫻林 郁之介  
 埼玉県大宮市天沼町1-847 自治医科大学 大宮医療センター内